

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 445–451

Enzymatisch und immunologisch bestimmtes Coeruloplasmin: Geschlechts- und Methodenunterschiede unter Östrogeneinnahme

Von H. Ebeling

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce) am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 20. März/5. Juni 1975)

Zusammenfassung: Unter Äthinylöstradiol-Einnahme von 1 µg/kg Körpergewicht und Tag kommt es bereits nach 14 Tagen zu hoch signifikanten methodenunabhängigen Coeruloplasmin-Zunahmen im Serum bei beiden Geschlechtern. Prozentual ausgedrückt verhalten sich unter Östrogenmedikation die mit der *p*-Phenylendiaminoxidase-Reaktion bestimmten Werte signifikant höher gegenüber den immunologisch-nephelometrisch ermittelten Coeruloplasmin-Konzentrationen. Als Ursache fand sich, daß enzymatisch mehrere Coeruloplasmin-Komponenten, hauptsächlich C und D_o, in die *p*-Phenylendiaminoxidase-Bestimmung mit eingingen, immunologisch jedoch hauptsächlich die Coeruloplasmin-D_o-Komponente erfaßt wurde.

Die signifikanten Geschlechtsunterschiede unter Östrogeneinnahme im *p*-Phenylendiaminoxidase-System können damit erklärt werden, daß bei Frauen C- und D-, bei Männern hauptsächlich nur D-Coeruloplasmine im Serum vorliegen. Unter Östrogenmedikation nimmt vor allem die D_o-Coeruloplasmin-Komponente zu, bei Frauen zusätzlich das Coeruloplasmin-C. Die signifikant höheren enzymatisch ermittelten Werte der Frauen gegenüber denen der Männer sind somit plausibel erklärt. Immunologisch waren die Geschlechtsunterschiede nur wahrscheinlich signifikant.

The enzymic and immunological determination of coeruloplasmin: sex- and method-dependent differences during the administration of oestrogens

Summary: After 14 days of 1 µg ethinyloestradiol per kg body weight per day, both sexes show highly significant increases in serum coeruloplasmin which are independent of the determination method. Expressed on a percentage basis, the concentrations of coeruloplasmin under oestrogen medication determined by the *p*-phenylendiamine oxidase reaction are significantly higher than those determined by the immunological-nephelometric method. This is because several coeruloplasmin components, mainly C and D_o, take part in the determination with *p*-phenylendiamine oxidase, whereas the immunological method measures chiefly the coeruloplasmin D_o component.

The significant sex differences under oestrogen medication shown by the determination with *p*-phenylendiamine oxidase, can therefore be explained by the presence of C- and D-coeruloplasmins in women, while the serum of men contains almost exclusively D-coeruloplasmins. Under oestrogen medication, the increase occurs primarily in the D_o-coeruloplasmin component, and women also show an increase in coeruloplasmin-C. The significant higher enzymatic concentrations in the serum of the women in contrast to the men are thus plausibly explained. With the immunological assay, the sex differences were only probably significant.

Einführung

Seit langem ist bekannt, daß während der Gravidität, bei Einnahme von Ovulationshemmern und unter Östrogen-gaben bestimmte Proteine einschließlich Enzyme im Serum Konzentrations- beziehungsweise Aktivitätsver-änderungen unterliegen.

So fand man z. B. erhöhte Coeruloplasmin- beziehungs-weise Kupfer-Konzentrationen im Serum unter diesen Einflüssen (1–4). Diese Coeruloplasminzunahme wird hauptsächlich mit einer östrogenbedingten Stimulation der Proteinbiosynthese erklärt (5). Jedoch werden neuer-

dings auch dem Progesteron coeruloplasmin-synthese-induzierende Eigenschaften spekulativ zugeschrieben (6). Der Hauptsyntheseort des Coeruloplasmins scheint die Leber zu sein. Daneben sollen dafür aber auch noch andere Organe in Frage kommen (5, 7).

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, erneut zu überprüfen, ob unter Östrogengaben Coeruloplasmin-Aktivitätszunahmen im Serum festzustellen sind. Dabei sollte auch getestet werden, wie hoch die Hormondosis sein muß, um signifikante Enzymaktivitätszunahmen zu induzieren.

Außerdem interessierte weiter, ob sich unter konstanter Hormondosis „coeruloplasmin“-methodenabhängige Unterschiede ergeben. Zur Klärung dieser Frage sollten sämtliche Proben der einen Versuchsserie vergleichend auf ihre *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität und ihre immunologisch bestimmbare Coeruloplasmin-Konzentration hin untersucht werden. Gleichzeitig sollte diese Versuchsserie, die aus weiblichen und männlichen Normalpersonen bestand, auch darüber Aufschluß geben, ob sich ohne und mit Östrogengaben Geschlechtsunterschiede ergeben würden.

Material und Methoden

Vorversuch

Zur Überprüfung der Zunahme enzymatisch aktiven Coeruloplasmins unter Östrogengaben verschieden hoher Dosen wurde in Anlehnung an *Musa et al.* (2) und *Briggs et al.* (8) verfahren. Aus zwölf gesunden männlichen Versuchspersonen (Alter 27–38 Jahre, \bar{x} 32,3 Jahre) wurden vier Gruppen zu je drei Mann gebildet. Über zehn Tage erhielt Gruppe 1 10 µg, Gruppe 2 20 µg, Gruppe 3 40 µg und Gruppe 4 80 µg Äthinylöstradiol (= 17 α -Äthinyl-1,3,5(10)-östradien-3,17 β -diol) täglich per os. Zur *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivitätsbestimmung wurden den Versuchspersonen Blutproben an zwei Tagen vor und während der Östrogeneinnahme am 3., 6., 7. und 10. Einnahmetag und nach Absetzen der Östrogene am 24. und 27. Tag nach Einnahmebeginn entnommen.

Versuchsserie

Zur Klärung methodenabhängiger „Coeruloplasmin“-Unterschiede unter Östrogeneinfluß und geschlechtsbedingter Unterschiede der „Coeruloplasmin“-Zunahme unter Östrogengabe wurden zwei Gruppen gebildet. Gruppe 1 bestand aus acht gesunden Männern (Alter 21–32 Jahre, \bar{x} 26,1 Jahre) und Gruppe 2 aus neun gesunden Frauen (Alter 23–34 Jahre, \bar{x} 26,7 Jahre), die seit mindestens drei Monaten keine Ovulationshemmer erhalten hatten. Den Frauen wurden während der Menstruationszeit die Ausgangswerte abgenommen, so daß man wie bei den Männern Basiswerte von zwei verschiedenen Tagen vor der Äthinylöstradiol-Zufuhr hatte. Für Frauen von einem 28-tägigen Zyklusrhythmus ausgehend, wurde der Frauengruppe ab 1. „Zyklus“-Tag täglich 1 µg Äthinylöstradiol pro kg Körpergewicht für 24 Tage per os verabreicht. Über die gleiche Zeitdauer erhielt die Männergruppe entsprechende Hormondosen. Zusätzlich bekamen beide Gruppen aus Paritätsgründen vom 14. bis zum 24. Einnahmetag täglich per os 5 mg Megestrolacetat (= 6-Methyl-6-dehydro-17 α -acetoxyprogesteron) zur besseren Kontrolle der Menstruationsblutungen bei der Frauengruppe. In dieser Versuchsserie wurden den Versuchspersonen an zwei verschiedenen Tagen vor und während der Äthinylöstradiol-Einnahmezeit am 4., 13., 14., 22. und 24. Einnahmetag Blutproben entnommen, die vergleichend auf ihre *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität und ihre immunologisch erfaßbare Coeruloplasmin-Konzentration hin untersucht wurden.

Die zur Bestimmung eingesetzten Seren waren für etwa drei bis vier Monate bei minus 20 °C eingefroren.

Die *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität wurde kinetisch durch Umsetzen von *p*-Phenylendiamin unter Standardbedingungen bei 37 °C mit dem Enzymtest der Firma Dr. Haury und unter Verwendung des EPPENDORF Enzym-Meßplatzes 5080 bei einer Meßdauer von drei Minuten bestimmt.

Die immunologische Coeruloplasmin-Bestimmung erfolgte in der von *Ebeling* (9) beschriebenen Weise mit der mechanisierten spezifisch-immunologisch-nephelometrischen Meßtechnik. Die dafür eingesetzten monospezifischen Antihuman-Seren vom Kaninchen und der lyophilisierte Coeruloplasmin-Standard (240 mg/l) waren Produkte der Firma BEHRINGWERKE AG.

Agargelelektrophoretische Untersuchungen mit anschließenden „coeruloplasmin“-spezifischen Reaktionen in Anlehnung an *Morell et al.* (10), *Richterich et al.* (11), *Scheiffarth et al.* (12) und *Götz* (13):

Agarose-Gel-Lösung: 15 g Agarose gelöst in 500 ml tridest. Wasser und 500 ml 0,1 mol/l Na-Acetat-Puffer pH 5,50.

Agargelelektrophoretische Auftrennung für 2 Stunden bei konstant 200 Volt mit der BOSKAMP-Kammer und Na-Acetat-Puffer-Lösung 0,1 mol/l, pH 5,50; anschließend a) Immundiffusion für 42 Stunden bei Raumtemperatur in feuchter Kammer mit Antihuman-Coeruloplasmin-Serum, monospezifisch vom Kaninchen (BEHRINGWERKE AG); beziehungsweise b) Enzymreaktion im Gel: Einlegen der Gelobjektträger für vier Stunden bei 37 °C in *p*-Phenylendiamin-Puffer-Lösung (5,53 mmol *p*-Phenylendiamin · 2HCl/l 0,1 mol/l Na-Acetat-Puffer pH 5,50).

Agargelelektrophoretisch untersuchtes Probenmaterial:

- I: frisches Serum eines 14 Stunden alten gesunden männlichen Neugeborenen.
- II: lyophilisierter Coeruloplasmin-Standard, 240 mg/l, (BEHRINGWERKE AG).
- III: Serum von Frau A. B. aus Versuchsserie
 - a) vor Östrogeneinnahme und
 - b) nach 24-tägiger Äthinylöstradiol-Einnahme von 1 µg/Tag und kg Körpergewicht.
- IV: Serum von Herrn Z. aus Versuchsserie
 - a) vor Östrogeneinnahme und
 - b) nach 24-tägiger Äthinylöstradiol-Einnahme von 1 µg/Tag und kg Körpergewicht.

Je Auftragsstelle wurden etwa 5 µl Probenmaterial eingefüllt.

Ergebnisse

Wie aus den Vorversuchen hervorgeht (Tab. 1), bestanden zwischen der gesunden Männern oral verabreichten Dosis von Äthinylöstradiol und der gemessenen *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität Dosis-Wirkungsbeziehungen. Dabei war für den 10. Einnahmetag für die Gruppe mit 10 µg/d und Person mit $p < 0,4$ kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert festzustellen. Die Gruppen mit 20 beziehungsweise mit 40 µg/d und Person ließen sich mit $p < 0,05$ wahrscheinlich und die Gruppe mit 80 µg/d und Person mit $p < 0,001$ hoch signifikant von ihren Ausgangsaktivitäten unterscheiden. Die Abbildung 1 stellt die gefundenen Ergebnisse für den 10. Einnahmetag in einer Dosis-Wirkungsbeziehungs-Kurve dar. Die eingezeichneten Standardabweichungen, in die sowohl die biologischen als auch die Methodenschwankungen eingehen, deuten an, daß eine signifikante Unterscheidung von Gruppe zu Gruppe nicht möglich war. Abbildung 2 zeigt, daß trotz nicht signifikanter Unterschiede von Gruppe zu Gruppe, eine zeitlich abhängige Dosis-Wirkungsbeziehung von Gruppe zu

Tab. 1. *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivitätsänderungen im Vorversuch unter verschiedener Äthynylöstradioldosierung (Gruppe 1 bis 4). 0 = Ausgangswerte, 3. II bis 10. II = unter und 24. III nach Östrogeneinnahme. Die \bar{x} -%-Werte beziehen sich auf die \bar{x}_{Basis} -Ausgangswerte, die gleich 100 Prozent gesetzt sind und geben somit die relativen Enzymaktivitätsveränderungen der jeweiligen Gruppe wieder.

p = Signifikanz nach t-Test gegenüber den jeweiligen Gruppenausgangswerten.

Blutabnahme- tage	Gruppe 1			Gruppe 2			Gruppe 3			Gruppe 4		
	$\bar{x}_{\text{Basis}} \pm s$ [U/l]	VK%		$\bar{x}_{\text{Basis}} \pm s$ [U/l]	VK%		$\bar{x}_{\text{Basis}} \pm s$ [U/l]	VK%		$\bar{x}_{\text{Basis}} \pm s$ [U/l]	VK%	
0(0 ₁ +0 ₂)	31,53 ± 6,46	20,5		25,79 ± 4,54	17,6		24,18 ± 5,73	23,7		21,65 ± 2,34	10,8	
	\bar{x} %	VK% p		\bar{x} %	VK% p		\bar{x} %	VK% p		\bar{x} %	VK% p	
3. II.	81,9	35,5 < 0,40		104,5	13,5 < 0,80		116,6	32,2 < 0,50		134,3	7,8 < 0,005	
6. II.	98,0	49,3 < 0,95		96,3	31,5 < 0,90		140,8	22,0 < 0,05		151,6	17,3 < 0,001	
7. II.	105,1	10,7 < 0,80		119,9	12,0 < 0,20		130,7	28,7 < 0,20		146,4	6,0 < 0,001	
10. II.	115,1	15,5 < 0,40		133,3	17,4 < 0,05		140,6	12,0 < 0,05		157,8	7,8 < 0,001	
24. III.	78,4	18,3 < 0,20		118,4	11,1 < 0,20		119,9	4,4 < 0,30		126,7	6,5 < 0,010	
27. III.	87,4	4,6 < 0,40		111,4	22,3 < 0,50		100,3	8,1 < 0,99		119,5	14,7 < 0,100	

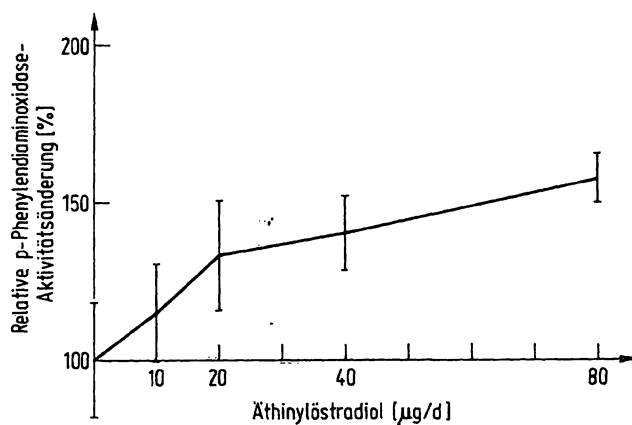


Abb. 1. Dosis-Wirkungsbeziehungskurve der Vorversuchsserie: Abszisse: Äthynylöstradiol-Dosis in $\mu\text{g/d}$, die pro Person der jeweiligen Gruppe oral verabreicht wurde. Ordinate: Relative *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivitätsveränderung in Prozent für den 10. Einnahmetag. Es wurden die mittleren relativen Enzymaktivitäten der jeweiligen Gruppe mit ihren Standardabweichungen dargestellt.

Gruppe festgestellt werden kann. Die Abbildung läßt erkennen, daß die Steilheit der Regressionsgeraden mit zunehmender Hormondosis in Abhängigkeit von der Hormoneinnahme-Zeitdauer ebenfalls zunimmt. Es wurde dabei eine lineare Korrelation zwischen Einnahmezeitdauer und der mittleren prozentualen Aktivitätsveränderung angenommen.

Abschließend kann zur ersten Versuchsserie festgestellt werden, daß die Äthynylöstradiol-Dosierung mit 1 $\mu\text{g/d}$ und kg Körpergewicht, wie sie dann in der zweiten Versuchsserie angewendet wird, ausreichend ist, um im *p*-Phenylendiaminoxidase-System signifikante Aktivitätszunahmen zu induzieren.

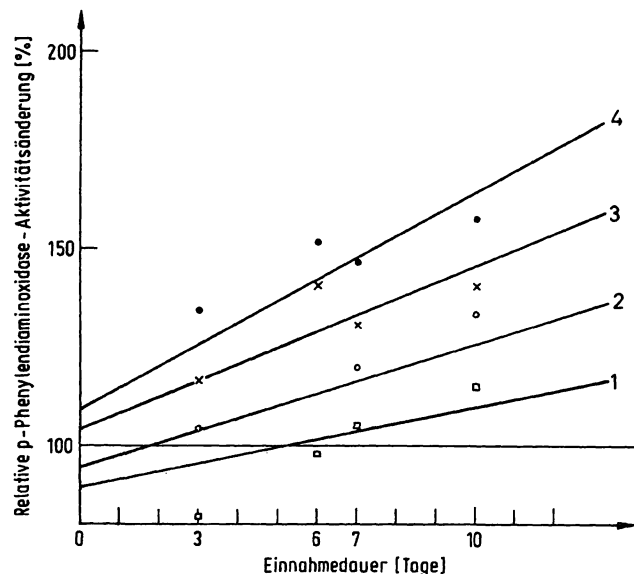


Abb. 2. Abhängigkeit der mittleren relativen *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivitätsveränderung in Prozent von der Einnahmezeitdauer vier verschiedener Äthynylöstradiol-Einnahmedosen pro Vorversuchsgruppe: Abszisse: Einnahmezeitdauer in Tagen. Ordinate: Relative *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivitätsveränderung in Prozent. Es wurden die mittleren relativen Enzymaktivitäten der jeweiligen Gruppe eingesetzt. Für die Kurven 1 bis 4, die den Gruppen 1 bis 4 entsprechen, wurden lineare Korrelationen zur Berechnung von r und der jeweiligen Regressionsgeraden vorausgesetzt: 1: $r = 0,65$ $y = 2,04x + 89,4$; 2: $r = 0,77$ $y = 3,11x + 94,6$; 3: $r = 0,92$ $y = 4,18x + 104,0$; 4: $r = 0,93$ $y = 5,56x + 109,1$.

Bei dieser zweiten größeren Versuchsserie ging es um den methodischen Vergleich zwischen beiden benutzten „Coeruloplasmin“-Bestimmungsverfahren. Dabei interessierte vergleichend das Verhalten der *p*-Phenylendiaminoxidase und das immunologisch erfaßbare Coeruloplasmin unter Äthynylöstradiol-Einnahme bei Frauen und Männern.

In Abbildung 3 ist der Methodenvergleich graphisch dargestellt. Bei Annahme einer linearen Korrelation zwischen immunologisch-nephelometrisch und enzymatisch ermitteltem „Coeruloplasmin“ ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,892$. Wenn man davon ausgeht, daß die volle enzymatische Aktivität im Coeruloplasmin-Standard von 240 mg/l, die mit $20,0 \text{ U/l} \pm s 1,0$ ermittelt wurde, erhalten geblieben ist, dann fällt eine geringere Steilheit der Coeruloplasmin-Standard-Kurve ($= y'$) gegenüber der Regressionsgeraden des Methodenvergleichs ($= y$) auf.

Eine Diskrepanz zwischen beiden Methoden fällt besonders auf, wenn man getrennt für Männer und Frauen einen Methodenvergleich anstellt (Tab. 2 und 3). Dazu wurden die erhaltenen Ausgangs-„Normal“-Werte gleich 100 Prozent gesetzt. Für die Frauengruppe ergab sich so gegenüber dem Ausgangswert am Ende der Östrogeneinnahmeperiode ein signifikanter methodischer Unterschied zwischen beiden benutzten „Coeruloplasmin“-Bestimmungsverfahren mit $p < 0,005$. Dies bedeutete, daß die *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivitätszunahme unter Östrogeneinnahme im Mittel um 23 Prozent über

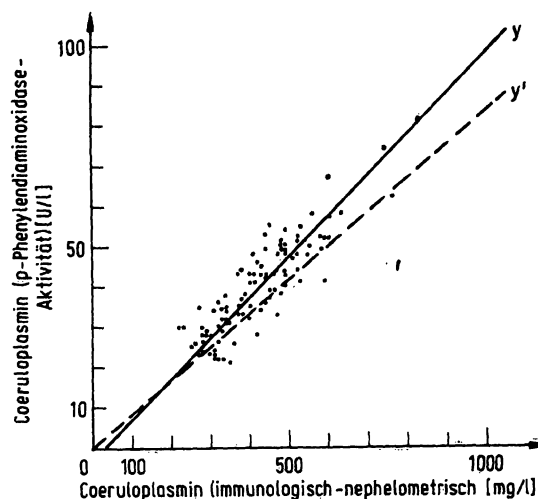


Abb. 3. Methodenvergleich zwischen beiden benutzten „Coeruloplasmin“-Bestimmungsverfahren:
Abszisse: Werte immunologisch-nephelometrisch in mg/l.
Ordinate: *p*-Phenylendiaminoxidase-Werte in U/l.
 $n = 119$, $r = 0,892$, $y = \text{bivariate Regressionsgerade des Methodenvergleichs} = 0,101 x - 3,08$; $y' = \text{Coeruloplasmin-Standardkurve (aus Standard 240 mg/l} \hat{=} 20,0 \text{ U/l)} = 0,083 x$.

Tab. 2. Coeruloplasmin enzymatisch bestimmt in der Gegenüberstellung von der Frauen- und Männergruppe aus der zweiten Versuchsserie:

p = Signifikanz nach t-Test gegenüber den Ausgangswerten.

Abnahmetage nach Einnahme	n = 9 ♀					n = 8 ♂				
	\bar{x} [U/l]	$\pm s$	VK %	Aktiv.- veränd. in %	p	\bar{x} [U/l]	$\pm s$	VK %	Aktiv.- veränd. in %	p
0(0 ₁ +0 ₂)	28,47	7,04	24,7	100		26,41	3,54	13,4	100	
4.	35,66	6,58	18,5	125,3	< 0,02	30,03	5,05	16,8	113,7	< 0,1
13.	43,38	5,02	11,6	152,4	< 0,001	35,99	4,82	13,4	136,3	< 0,001
14.	47,13	6,16	13,1	165,5	< 0,001	37,76	3,31	8,75	143	< 0,001
22.	53,11	11,54	21,7	186,5	< 0,001	45,06	7,60	16,9	170,6	< 0,001
24.	58,69	11,22	19,1	206,1	< 0,001	45,76	5,51	12,0	173,3	< 0,001

Tab. 3. Coeruloplasmin immunologisch-nephelometrisch bestimmt in der Gegenüberstellung von der Frauen- und Männergruppe aus der zweiten Versuchsserie:

p = Signifikanz nach t-Test gegenüber den Ausgangswerten.

Coeruloplasmin, immunologisch										
Abnahmetage nach Einnahme	n = 9 ♀					n = 8 ♂				
	\bar{x} [mg/l]	$\pm s$	VK %	Konz.- veränd. in %	p	\bar{x} [mg/l]	$\pm s$	VK %	Konz.- veränd. in %	p
0(0 ₁ +0 ₂)	324,4	54,6	16,8	100		294,4	37,5	12,7	100	
4.	390,0	49,5	12,7	120,2	< 0,01	315,3	44,7	14,2	107,1	< 0,3
13.	469,7	56,2	12,0	144,8	< 0,001	423,0	85,6	20,2	143,7	< 0,001
14.	489,7	70,2	14,3	150,9	< 0,001	423,2	50,6	12,0	143,8	< 0,001
22.	541,0	105,5	19,4	166,7	< 0,001	452,2	84,6	18,7	153,6	< 0,001
24.	577,7	117,8	20,4	178,1	< 0,001	481,0	95,3	19,8	163,4	< 0,001

dem immunologisch bestimmten Coeruloplasmin lag. Beim Methodenvergleich der Männerwerte ergab sich am Ende der Östrogeneinnahmezeit ein mit $p < 0,05$ nur wahrscheinlich signifikanter Unterschied. Hier lag die *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität nur um 13,5 Prozent im Mittel über dem immunologisch bestimmten Coeruloplasmin.

Diese getrennt nach Geschlechtern sich ergebenden Methodenunterschiede wiesen darauf hin, nun auch isoliert für jede Methode nach geschlechtsunterschiedlichem Verhalten der Aktivitäts- beziehungsweise Konzentrations-Zunahme des „Coeruloplasmins“ unter Östrogeneinnahme zu suchen. Mit der *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität ließ sich vor der Östrogenmedikation die Frauen- von der Männergruppe mit $p < 0,3$ nicht signifikant unterscheiden. Im Verlauf der Äthinyl-östradioleinnahme kommt es jedoch bereits nach 14 Tagen mit $p < 0,005$ zu signifikanten und nach über drei Wochen mit $p < 0,001$ zu hoch signifikanten Geschlechtsunterschieden. Die *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität lag nämlich nach über drei Wochen Einnahmezeit im Mittel um fast 24 Prozent über der der Männergruppe.

Anders verhielt sich der Geschlechtsvergleich mit dem immunologisch bestimmten Coeruloplasmin. Mit den Ausgangswerten vor der Östrogenmedikation ergab sich hier ebenfalls mit $p < 0,1$ kein signifikanter Unterschied zwischen der Frauen- und der Männergruppe. Auch nach 14-tägiger Äthinylöstradiol-Einnahmezeit ließ sich mit $p < 0,6$ statistisch kein Geschlechtsunterschied feststellen. Erst am Ende der Einnahmezeit ergab sich mit $p < 0,05$ ein wahrscheinlich signifikanter Unterschied zwischen beiden Geschlechtern. Dies bedeutete, daß nach über dreiwöchiger Östrogeneinnahme-Zeitdauer das immunologisch bestimmte Coeruloplasmin mit fast 14 Prozent bei der Frauengruppe im Mittel über dem der Männergruppe lag.

Diese gefundenen methoden- und geschlechtsabhängigen Diskrepanzen der benutzten „Coeruloplasmin“-Bestimmungsverfahren versuchten wir auch agargelelektrophoretisch mit anschließenden „coeruloplasmin“-spezifischen Reaktionen aufzuklären. Die fotografischen Abbildungen (Abb. 4 und 5) geben von ausgesuchten Einzelfällen (siehe unter: Material und Methoden) die *p*-Phenylendiaminoxidase- und die Immundiffusions-Reaktionen nach elektrophoretischer Proteinauftrennung bei pH 5,50 und 0,1 mol/l Na-Acetat-Puffer wieder. Zusammen mit den mit einem ZEISS-Extinktionsschreiber aufgezeichneten Kurven der *p*-Phenylendiamin-Reaktionen im Gel (Abb. 6) ergaben sich folgende methodische und geschlechtsspezifische Unterschiede:

1. Enzymatisch ergaben sich mehrere, mit Sicherheit jedoch zwei Haupt-„Coeruloplasmin“-Komponenten, die in unterschiedlicher Quantität beim Menschen vorzukommen scheinen: Beim Neugeborenen praktisch nur

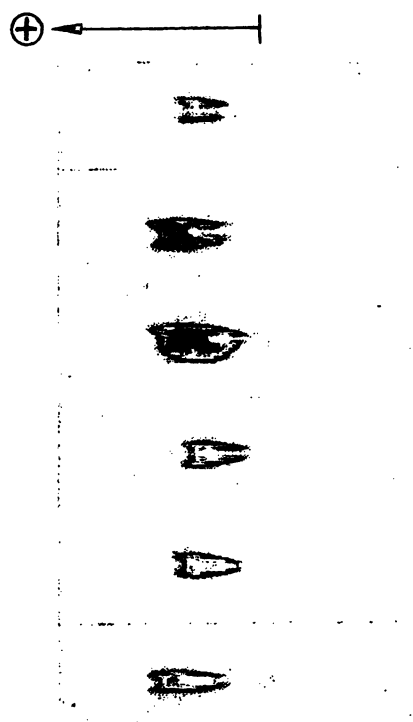


Abb. 4.

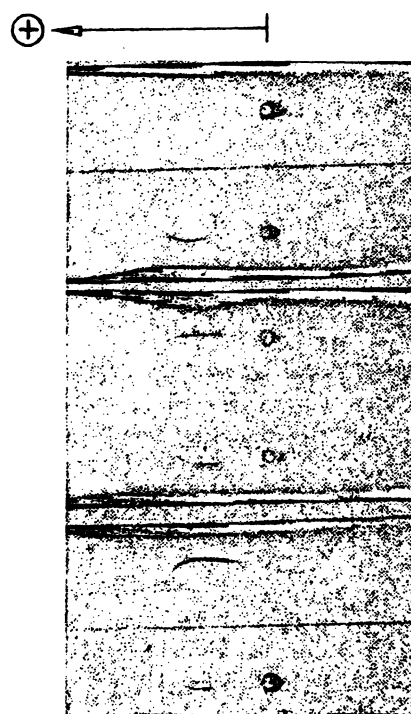


Abb. 5.

Abb. 4 und 5. „Coeruloplasmin“-spezifische Darstellungen nach agargelelektrophoretischen Auftrennungen bei pH 5,50
Abb. 4. *p*-Phenylendiaminoxidase-Reaktionen
Abb. 5. Immunspezifische Reaktionen

Auf beiden fotografischen Abbildungen sind von oben nach unten dargestellt: 1. Neugeborenen-Serum, 2. Frauenserum vor und 3. nach Östrogenmedikation, 4. Männerserum vor und 5. nach Östrogenmedikation, 6. Coeruloplasmin-Standard-Serum.

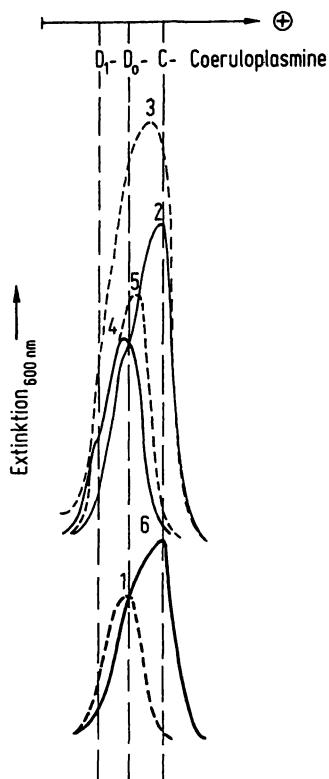


Abb. 6. Extinktionskurven der in Abbildung 4 wiedergegebenen nach agargelelektrophoretischer Auftrennung bei pH 5,50 durchgeführten *p*-Phenylendiaminoxidase-Reaktionen: Die Kurven 1–6 entsprechen den Material-Numerierungen der Abbildungen 4 und 5. Die Zuordnung der Peaks zu D₁-, D₀- und C-Coeruloplasminen erfolgte in Anlehnung an Morell & Scheinberg (10) und Richterich et al. (11).

eine Komponente (= D₀), beim Mann ebenfalls hauptsächlich D₀ neben einer nur quantitativ geringen noch mehr kathodisch als D₀ liegenden D₁-Komponente und bei der Frau vor allem D₀ und die am weitesten anodisch liegende C-Komponente.

2. Nach Östrogenmedikation schien vor allem der D₀-Anteil des Coeruloplasmins im Serum zugenommen zu haben, obwohl bei der Frau zusätzlich die Coeruloplasmin-C-Komponente mit angestiegen war.

3. Das eingesetzte Antiserum verhielt sich nephelometrisch und in der zweidimensionalen Geldoppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony monospezifisch. Die anschließende Immundiffusion nach der bei pH 5,50 durchgeführten Gelelektrophorese ergab ebenfalls nur eine Präzipitationslinie. Durch Zuordnen zu den gelenzymatischen Reaktionszonen ergab sich, daß das benutzte Antihuman-Coeruloplasmin-Serum hauptsächlich gegen die Coeruloplasmin-D-Komponente gerichtet zu sein schien.

Diskussion

Mit niedrigen Äthinylöstradiol-Dosen, die weit unter der sogenannten „vollen endometrialen Proliferationsdosis“ (14) lagen, konnten wir erneut alte Befunde über

eine östrogeninduzierte „Coeruloplasmin“-Zunahme im Serum bestätigen (2,5). Entsprechend den Befunden von Briggs et al. (8) an einer Frauengruppe konnten hier Äthinylöstradiol-Dosis-Wirkungsbeziehungen auf das *p*-Phenylendiaminoxidase-System an einem kleinen Männerkollektiv ebenfalls festgestellt werden.

Unsere zweite Versuchsserie bestätigt für beide „Coeruloplasmin“-Bestimmungsverfahren die Befunde aus der Literatur, daß es zwischen Männern und Frauen bei Normalpersonen keine signifikanten Unterschiede gibt (5, 15, 16). Trotz untersuchter kleiner Kollektive ordnen sich unsere „Normal“-Werte in die von andern Autoren bereits mehrfach publizierten Werte ein, obwohl enzymatisch wie immunologisch die Männerwerte bei uns niedriger zu sein scheinen. Unsere immunologisch ermittelten Coeruloplasmin-Konzentrationen mit der mechanisierten Immunpräzipitation stimmen gut mit der einfachen radialen Immundiffusion überein (17), die bisher die Methode der Wahl für quantitative immunologische Coeruloplasmin-Bestimmungen war.

Die von uns in der zweiten Versuchsserie gefundenen methoden- und geschlechtsabhängigen Unterschiede unter Äthinylöstradiol-Einnahme, lassen erneut die Diskussion nach der Existenz verschiedener Coeruloplasmine aufkommen (10, 11). In Bestätigung der Befunde von Morell et al. (10) und Richterich et al. (11) konnten wir gleichfalls eine Coeruloplasmin-Heterogenität mit mehreren Komponenten enzymatisch feststellen. Orientierungspunkt für die Coeruloplasmin-C- und D-Zuordnung war das Neugeborenen-Serum, das hauptsächlich Coeruloplasmin-D haben soll (18). Unser frisch eingesetztes Neugeborenen-Serum zeigte ebenfalls nur eine enzymatische Komponente, die wir als Coeruloplasmin-D aufgrund ihrer weniger anodischen Wanderung gegenüber Coeruloplasmin-C identifizieren konnten (10, 11). Den Befunden von Richterich et al. (11, 18), wonach Erwachsene hauptsächlich Coeruloplasmin-C haben sollen, kann nur für Frauen entsprochen werden. Bei Männern konnten wir in den untersuchten Fällen hauptsächlich nur Coeruloplasmin-D wie beim Neugeborenen finden. Unter Östrogeneinfluß nahm bei den agargelelektrophoretisch untersuchten Fällen der zweiten Versuchsserie vor allem bei den Frauen Coeruloplasmin-D₀ aber auch die Coeruloplasmin-C-Komponente stark zu. Mit diesen Befunden stehen wir im Einklang mit den von Richterich et al. erhaltenen Ergebnissen, die besagen, daß bei erhöhten Coeruloplasminwerten vor allem D zunimmt bei generell parallelem Verhalten von C und D (11, 18). Für Männer scheinen offensichtlich hier gegenüber Befunden von Richterich Differenzen vorzuliegen. Bei den untersuchten Männerseren fanden wir hauptsächlich nur das D-Coeruloplasmin und zwar sowohl vor als auch nach Östrogeneinnahme.

Nach Angaben von Götz (13) wird durch Östrogen ausschließlich die Coeruloplasmin-C-Komponente aktiviert. Mit unsern Untersuchungen können wir dieses nicht be-

stätigen. Vielmehr konnte von uns nachgewiesen werden, daß hauptsächlich die Aktivität von Coeruloplasmin-D unter Östrogenmedikation zunahm, zusätzlich kommt es aber auch bei Frauen zu einer Coeruloplasmin-C-Aktivitätszunahme, wie wir es enzymatisch nach Agar-gelelektrophorese aufzeigen konnten.

Unsere Immundiffusionsreaktionen nach durchgeführter agargelelektrophoretischer Auftrennung ergaben, daß hauptsächlich die Coeruloplasmin-D₀-Antigen-Komponente mit dem benutzten Antiserum erfaßt wurde.

Diese gelelektrophoretischen Befunde mit anschließenden „coeruloplasmin“-spezifischen enzymatischen und immunologischen Reaktionen hellen etwas die Diskrepanzen der zweiten Versuchsserie auf bezüglich festgestellter Methoden- und Geschlechts-Unterschiede.

Abschließend kann festgestellt werden:

1. Schon bereits nach 14-tägiger Einnahme von Äthinyl-östradiol in einer Dosis von 1 µg/kg Körpergewicht und Tag kann methodenunabhängig sowohl bei Männern wie bei Frauen ein hoch signifikanter „Coeruloplasmin“-Anstieg im Serum gegenüber den Ausgangswerten festgestellt werden.
2. In Abhängigkeit von der benutzten Coeruloplasmin-Bestimmungsmethode, enzymatisch oder immunologisch, verhält sich die „Coeruloplasmin“-Zunahme unter Östrogeneinfluß verschieden:
Die *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivität nimmt prozentual stärker zu als das immunologisch erfaßbare Coeruloplasmin. Die Erklärung dafür ist, daß immunologisch

hauptsächlich Coeruloplasmin-D₀ erfaßt wurde, während enzymatisch noch zusätzlich die C-Komponente neben einer D₁-Komponente in die Aktivitätsbestimmung mit einging.

3. In Abhängigkeit vom Geschlecht treten ebenfalls unter Östrogengaben quantitative Unterschiede auf: Bereits nach 14-tägiger Äthinylöstradioleinnahme ergaben sich signifikante *p*-Phenylendiaminoxidase-Aktivitätsunterschiede zwischen Männern und Frauen. Bei den Männern geht nur die Coeruloplasmin-D-Komponente in die *p*-Phenylendiaminoxidase-Bestimmung ein, bei der Frau zusätzlich noch die C-Komponente. Weniger signifikante Geschlechtsunterschiede erbrachte die immunologische Coeruloplasmin-Bestimmung. Unter Äthinylöstradiol-Einnahme ließ sich erst nach über dreiwöchiger Einnahmezeit ein wahrscheinlich signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen immunologisch feststellen. Dies erklärt sich damit, daß hauptsächlich nur die Coeruloplasmin-D₀-Komponente mit dem eingesetzten Antiserum erfaßt wurde und die D₀-Zunahme bei Frauen wahrscheinlich signifikant größer ist als bei Männern unter Östrogeneinwirkung.

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Untersuchungsmaterials der beschriebenen Äthinylöstradiol-Versuchsserien, deren Planung und Zusammenstellung einer anderen Fragestellung galten, danke ich Herrn Prof. Dr. W. Oelkers und Frau Dr. A. Blümel, Medizinische Klinik am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin.

Literatur

1. Russ, E. M. & Raymunt, J. (1956), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 465–466.
2. Musa, B. U., Seal, U. S. & Doe, R. P. (1965), *J. Clin. Endocrinol.* 25, 1163–1166.
3. Carruthers, M. E., Hobbs, C. B. & Warren, R. L. (1966), *J. Clin. Pathol.* 19, 498–500.
4. Laurell, C.-B., Kullander, S. & Thorell, J. (1967), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 337–343.
5. Mondorf, A. W., Mackenrodt, G. & Halberstadt, E. (1971), *Klin. Wochenschr.* 49, 61–70.
6. Sato, N. & Henkin, R. J. (1973), *Amer. J. Physiol.* 225, 508–512.
7. Planas, J. & Frieden, E. (1973), *Amer. J. Physiol.* 225, 423–428.
8. Briggs, M. H. & Briggs, M. (1971), *Contraception* 3, 381–386.
9. Ebeling, H. (1973), *diese Z.* 11, 209–214.
10. Morell, A. G. & Scheinberg, I. H. (1960), *Science* 131, 930–932.
11. Richterich, R., Temperli, A. & Aebi, H. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 56, 240–251.
12. Scheiffarth, F., Götz, H. & Knopf, H. (1961), *Acta Haematol.* 26, 169–181.
13. Götz, H. (1973), *Immunologische Plasmaprotein-Diagnostik*, S. 160–163, Verlag Walter de Gruyter, Berlin.
14. Lauritzen, C. (1975), *Deut. Ärzteblatt* 72, 205–212.
15. Dotchev, D., Liappis, N. & Hungerland, H. (1973), *Clin. Chim. Acta* 44, 431–435.
16. Henry, R. J., Cannon, D. C. & Winkelman, J. W. (1974), *Clinical Chemistry Principles and Technics*, 2. Aufl., S. 864, Verlag Harper & Row, Hagerstown, Maryland, U.S.A.
17. Schmidt, H., Ebeling, H. & Kraft, D. (1975), *diese Z.*, 13, 117–121.
18. Richterich, R. (1960), *Lancet II*, 1294–1295, Conference on Wilson's Disease.

Dr. Herwig Ebeling
Institut für Klinische Chemie
und Klinische Biochemie
Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
D-1000 Berlin 45,
Hindenburgdamm 30

